Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Freien Universität Berlin im Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhaus

Direktor: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r

ÜBER DIE PHOSPHATIDSYNTHESE DER EPIDERMIS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1968

vorgelegt von

Maria-Luise Kern
aus Baden-Baden

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Freien Universität Berlin im Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhaus

Direktor: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r

ÜBER DIE PHOSPHATIDSYNTHESE DER EPIDERMIS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Maria-Luise Kern
aus Baden-Baden

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r

Referent: Priv.Doz. Dr. med. Eberhard S c h w a r z

Korreferent: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 12. März 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

1. Bedeutung der Phosphatide
2. Phosphatidgehalt der Haut
3. Einbau radioaktiver Isotope in die Phosphatide der Haut
4. Ziel der Arbeit

B. Eigene Untersuchungen

I. Material und Methodik

1. Inkubationsansatz
2. Phosphatidextraktion
3. Wässrige Extraktion und Trypsindigestion
4. Radioaktivitätsmessung
5. Dünnschicht-Chromatographie (DC)
6. Autoradiographie (AR)
7. Hydrolyse der Phosphatide

II. Ergebnisse

1. Radioaktivitätsmessung
2. DC und AR der Epidermis-Phosphatide
3. DC und AR von x_1, x_2
4. DC und AR des Phosphatidhydrolysates
5. DC und AR der Fraktion H
6. DC und AR der Fraktionen F_x und G_1
   a) eindimensional
   b) zweidimensional

C. Diskussion

1. Besprechung der Ergebnisse
2. Kritik der Methode
3. Lücken der Arbeit

D. Zusammenfassung

E. Literatur

A. Einleitung

Bedeutung der Phosphatide

Die Phosphatide sind integrierende Struktur- und Funktionselemente jeder lebenden Zelle. Als Protein-Phosphatid-Cholesterin-Komplex bilden sie die Plasmamembranen der Zellen und Zellorganellen und das endoplasmatische Reticulum (34). Sie garantieren die Aufrechterhaltung des kolloidalen Zustands des Zytoplasmas (41) und vermitteln den Stoffaustausch der Zelle mit ihrer Umwelt. Nicht strukturgebundene Phosphatide fungieren als Energielieferanten. Sie sind am Transport und Stoffwechsel der Fettsäuren beteiligt (1). In einigen Enzymen sind Phosphatide als wesentliche Bestandteile nachgewiesen worden, wie z.B. beim mitochondralen Elektronentransport und der oxydativen Phosphorylierung (8, 12, 23, 30, 31, 32).

In Analogie zur Bedeutung der Phosphatide beim Aufbau der Zellmembranen steht ihr Vorkommen in der Barriere des Stratum corneum (7). Im Zuge der Keratinisation werden die Membranen der Zellorganellen zerstört; die Zellmembranen hingegen werden dicker und bilden eine Barriere im unteren Anteil der Hornschicht (34). Als Funktionen dieser Barriere gelten die Regulation der percutanen Resorption und des transepidermalen Wassertransportes (39). Die bei der Destruktion der Zellorganellen frei werdenden Phosphatide gehen vermutlich in den Verhornungsprozeß ein (18, 42).

Wir können heute noch nicht die Vielzahl physiologischer und biochemischer Vorgänge übersehen, an denen die Phosphatide beteiligt sind. Völlig unbekannt ist uns die Wirkungsweise der Phosphatide bei solchen Vorgängen.

Phosphatidgehalt der Haut

Phosphatide finden sich besonders reichlich in stoffwechselaktiven Geweben. Maligne Tumoren enthalten z.B. dreimal mehr Phosphatide als gutartige Geschwülste (4). Die Haut junger Säugetiere ist wesentlich reicher an Phosphatiden als die erwachsener Tiere (38). Im Reparationsgewebe der Rattenhaut beträgt der Phosphatidgehalt 30 % des gesamten Lipidgehaltes verglichen mit 3 % im normalen Gewebe (44). Die basalen Epidermisschichten weisen als Regenerationszone mit

2,62 % (bezogen auf Trockengewicht) einen viermal so hohen Phosphatidgehalt auf wie die Gesamt-Epidermis (26). Mit dem Emporwandern der sich differenzierenden Zellen zur Peripherie nimmt der Phosphatidgehalt ab (24, 34) und beträgt in der Hornschicht nur noch 0,14 % (26).

Histochemisch ist das Maximum der Phosphatide im Stratum granulosum nachweisbar (5). Im übrigen lebenden Zellepithel und in der Hornschicht sollen sie als Lipoprotein-Komplexe (19) resp. an Keratin gebunden (7) maskiert und damit histochemisch stumm vorliegen.

Unter den einzelnen Phosphatiden ist in der Haut Lecithin am stärksten vertreten. Beim Kaninchen entfielen 50 % des Lipid-Phosphors auf Lecithin (43), noch durchaus nachweisbar waren Kephalin und Phosphatidylserin, während Polyglycerinphosphatide, Lysolecithin und Plasmalogene nur in geringer Menge, zwei unbekannte Lipoide (darunter wohl Lysokephalin?) nur in Spuren vorlagen. In menschlicher Epidermis entfällt auf Lecithin über 30 % des Lipid-Phosphors, auf Kephalin, Phosphatidylserin und Sphingomyelin je über 10 % (2, 10). Andere Phosphatidfraktionen sind nur in geringer Menge vorhanden oder quantitativ unzureichend erfaßt, wie z.B. Phosphatidylinosit, das 12,90 % des Lipid-Phosphors nach BLOMSTRAND (2) bzw. 2,8 % nach GERSTEIN (10) enthalten soll.

Einbau radioaktiver Isotope in die Phosphatide der Haut

Zur Frage der autochthonen Phosphatidsynthese der Haut fanden LEONHARDI et al. (28) und v. GLASENAPP (11) nach $H_3{}^{32}PO_4$ - Verfütterung eine der Abnahme markierter Monoaminophosphatide in der Leber umgekehrt proportionale Zunahme in der Haut. Nach partieller Hepatektomie war die Markierung der Haut-Phosphatide reduziert. Bei oralem Angebot a priori radio-etikettierter Phosphatide fanden sich diese unverändert sowohl in der Leber wie in der Haut wieder und hatten eine stärkere Phosphatid-Markierung in beiden Organen zur Folge als bei Angebot von organischem ^{32}P. Die Autoren hielten deshalb eine Haut-autochthone Phosphatidsynthese für unwahrscheinlich, zumal auch Inkubationsversuche mit Hautstückchen und ^{32}P-Phosphat in vitro nur eine Inkorporierung im Rahmen der Fehlerbreite ergeben hatten.

Die Resultate von LEONHARDI und Mitarbeitern lassen sich besser dahingehend interpretieren, daß in der Haut auch nicht autochthone Phos-

phatide vorliegen und zwar in Epidermis und Corium in verschiedenem Maße. Anderen Autoren (6, 29, 46, 47) gelang es, Anhaltspunkte für eine selbständige Phosphatidsynthese der Haut zu finden.

So konnten CARNEY et al. (6) und später YARDLEY et al. (46) in einem Lipidextrakt aus Hautstückchen, die mit ^{32}P-Phosphat inkubiert waren, Radioaktivität nachweisen. Unter der Voraussetzung, daß der Extrakt keine radioaktiven Verunreinigungen enthielt, spricht diese Beobachtung für eine Phosphatidsynthese in vitro. Weiterhin gelang es YARDLEY und Mitarbeitern (46, 47) bei Inkubationsversuchen ^{32}P-markiertes Glycerylphosphoryl-cholin, -äthanolamin, -serin und -inosit autoradiographisch darzustellen. Der Nachweis dieser Substanzen, die durch hydrolytische Abspaltung zweier Fettsäuren vom Phosphatidmolekül entstehen - enzymatisch oder bei der sauren Extraktion -, kann als indirekter Beweis für die Phosphatidsynthese in der überlebenden Epidermis gewertet werden.

Für eine hauteigene Biogenese der Phosphatide sprechen auch die Beobachtungen von LIPKIN und Mitarbeitern (29). Nach in-vivo-Perfusion der Haut mit ^{14}C-markiertem Acetat, Pyruvat, Alanin, Valin und Isoleucin konnten sie radio-etikettierte Phosphatide nachweisen.

Ziel der Arbeit

In den oben zitierten Arbeiten wurde der Einbau radioaktiver Isotope in Phosphatide durch Aktivitätsmessungen von Lipidextrakten bestimmt, die ein Gemisch aus mehreren Phosphatiden darstellten und möglicherweise Verunreinigungen beinhalteten, oder es wurden Spaltprodukte verschiedener Phosphatidklassen isoliert. Der direkte Beweis für die Synthese einzelner Phosphatidfraktionen steht somit noch aus.

Bei der Lipogenese von Squalen, Cholesterin und Fettsäuren konnten Unterschiede in den einzelnen Hautschichten festgestellt werden (14,33). So synthetisiert z.B. die Epidermis vorwiegend Cholesterin, die Cutis einschließlich der Talgdrüsen Squalen. Die Fettsäuren werden in beiden Hautteilen lebhaft aufgebaut, in der Cutis jedoch in stärkerem Maße als in der Epidermis. Alle bisherigen Untersuchungen über die Phosphatidsynthese lassen die Zweiteilung der Haut in Epidermis und Cutis unberücksichtigt. Da es sich um zwei entwicklungsgeschichtlich, allgemein-histologisch, cytologisch und biochemisch völlig verschie-

dene Strukturen handelt, ist anzunehmen, daß auch die Biogenese der Phosphatide in beiden variiert und in Korrelation zum Zellgehalt, der Stoffwechselaktivität und Proliferationsrate steht. In dieser Arbeit soll daher durch Inkubation von Meerschweinchenepidermis mit Äthanolamin-^{14}C untersucht werden, ob die sich lebhaft regenerierende (mausernde) Epidermis zu einer selbständigen Kephalinsynthese befähigt ist.

B. Eigene Untersuchungen

I. Material und Methodik

Inkubationsansatz

Für 5 Versuche wurde je ein weißes Meerschweinchen (Gewicht 400 bis 700 g) rasiert, anschließend durch Nackenschlag getötet und nach Ausbluten enthäutet. Die Epidermis wurde von der Cutis unter Dehnung mit dem stumpfen Skalpell abgeschabt (40). Zu 3 g Epidermis - das Gewicht wurde im Medium bestimmt - wurden 30 ml Krebs-Ringer-Phosphat (pH 7,4), 1,5 mg Streptomycinsulfat und 5 µC (= 3,5 µMol) Äthanolamin-^{14}C * gegeben. Bei zwei Versuchen (Nr. 4 und 5) wurden 600 µ Mol Glukose zugesetztund die Streptomycinmenge auf 5 mg erhöht. Krebs-Ringer-Phosphat wurde unmittelbar vor der Inkubation aus kohlendioxydfreiem Aqua dest. und analysereinen Substanzen hergestellt (27). Der Ansatz wurde 4 Std. bei 37° C im "Roller" inkubiert. Die Sterilitätsprüfung erfolgte anschließend durch Ausstreichen einer Probe mittels Drahtöse auf Hammelblutagar und 24-stündiger Bebrütung bei 37° C. Gestoppt wurde der Inkubationsansatz durch Zugabe von 60 ml Alkohol-Äther (3:1).

Der weitere Untersuchungsgang ist in Schema I zusammengefaßt und wird unter Bezugnahme auf die dort benutzten Bezeichnungen im folgenden erläutert.

Phosphatidextraktion

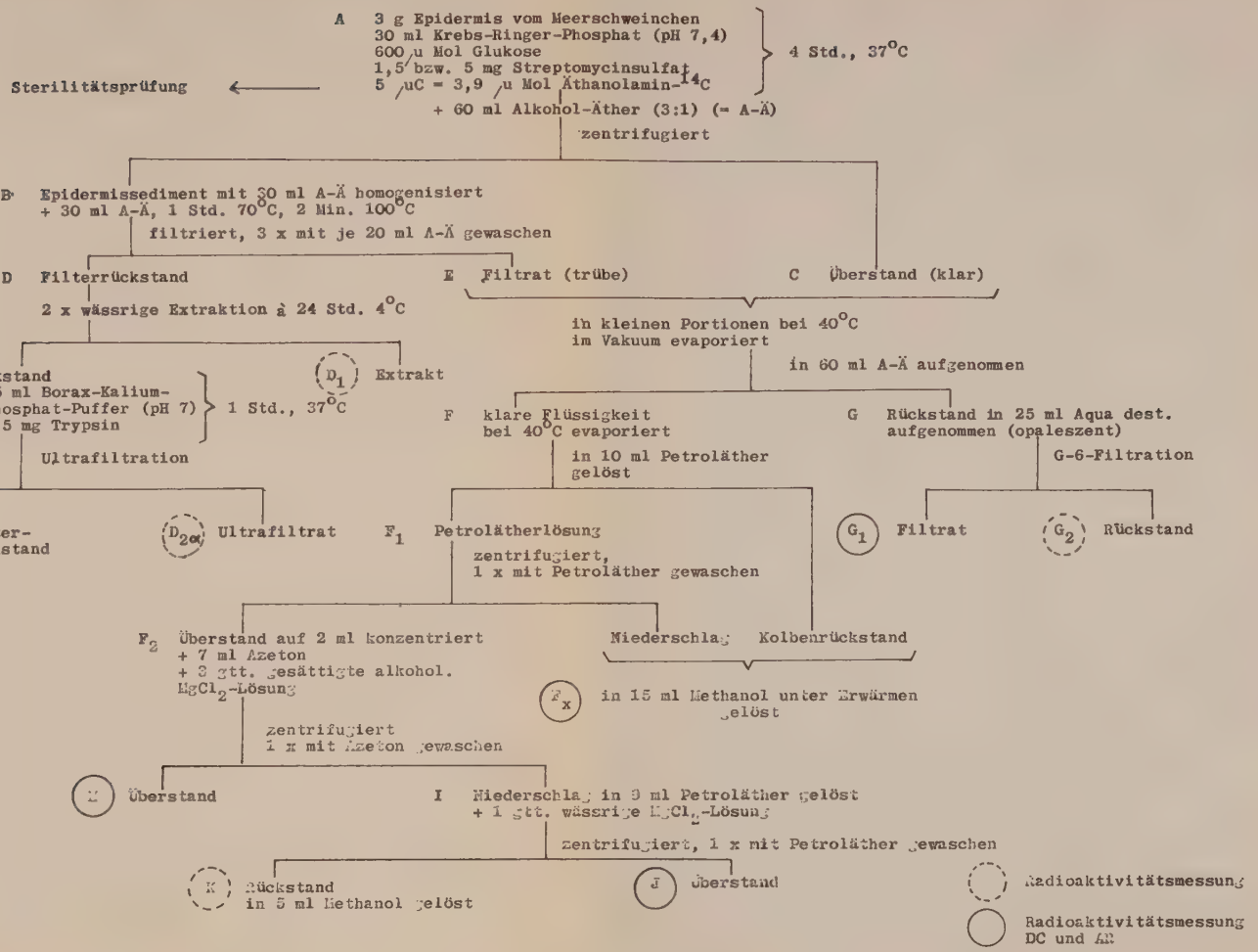
Zur Lipidextraktion wurde die Methode nach OUTHOUSE und FORBES (35) variiert. Das gestoppte Inkubat (A) wurde zentrifugiert. Das Epidermis enthaltende Zentrifugat (B) wurde mit 30 ml Alkohol-Äther homogenisiert, nach Zugabe von weiteren 30 ml Alkohol-Äther 1 Std. bei 70° C im Wasserbad gehalten und anschließend zwei Minuten lang zum Sieden gebracht. Nach Filtration mit in Alkohol-Äther entfettetem Papier wurde der Rückstand noch dreimal mit je 20 ml Alkohol-Äther gewaschen. Der Extrakt (E) wurde mit der abzentrifugierten Inkuba-

---

* Äthanolamin 1,2-^{14}C-hydrochlorid, New England Nuclear Corp., Boston

Schema I

E p i d e r m i s a u f a r b e i t u n g



tionslösung (C) vereinigt und in kleinen Portionen bei 40° C im Vakuum evaporiert. Die Lipide wurden erneut in Alkohol-Äther aufgenommen (F) und bei 40° C eingeengt. Der unlösliche Kolbenrückstand (G) wurde in Wasser aufgenommen und durch G-6-Filtration* von opaleszenten Trübungen befreit. Zur Phosphatidfällung nach BLOOR (3) wurden die Lipide in 10 ml Petroläther aufgenommen; unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert und zusammen mit dem Kolbenrückstand in 15 ml Methanol gelöst (F_x). Die Petrolätherlösung (F_2) wurde auf 2 ml konzentriert. Durch Zugabe von 7 ml redestilliertem Aceton und drei Tropfen einer gesättigten alkoholischen Magnesiumchloridlösung wurden die Phosphatide ausgefällt. Der Niederschlag (I) wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, mit Aceton gewaschen und in peroxydfreiem Petroläther gelöst, wobei Spuren von ungelöster Substanz und ein Tropfen wässrige Magnesiumchloridlösung durch Zentrifugieren entfernt wurden (K). Die in Aceton verbliebenen Lipide (H) sowie die in Petroläther gelösten Phosphatide (J) wurden vom Lösungsmittel befreit. Fraktion J wurde in 0,5 ml Chloroform aufgenommen, Fraktion H in 1 ml; von beiden Lösungen wurde ein Aliquot zur Radioaktivitätsmessung entnommen und der Rest bei 4° C für die Dünnschicht-Chromatographie verwahrt. Die bei der Phosphatidextraktion eliminierten Nebenprodukte F_x, G_1 und G_2 wurden ebenfalls durch Radioaktivitätsmessungen erfaßt.

Wässrige Extraktion und Trypsindigestion

Der nach der Lipidextraktion verbleibende Epidermisrückstand (D) wurde zweimal für je 24 Std. mit 30 ml Aqua dest. im Kühlschrank bei 4° C auf dem Magnetrührer extrahiert und anschließend zentrifugiert. Die Radioaktivität der wässrigen Lösung (D_1) wurde gemessen; der Rückstand (D_2) wurde in 25 ml Borax-Kaliumbiphosphat-Puffer (pH 7,0) nach KOLTHOFF (25) aufgenommen und mit 2,5 mg Trypsin (etwa 500 000 Fuld-Groß-Einheiten) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Digestionsansatz mit Gaze vorfiltriert und schließlich ultrafiltriert**. Der Filterrückstand ($D_{2\beta}$) wurde in 15 ml Wasser aufgenommen. Rückstand und Ultrafiltrat ($D_{2\alpha}$) wurden bei - 15° C bis zur Radioaktivitätsmessung aufgehoben.

---

*Membranfilter Gruppe 6, Fa. Satorius, Göttingen
**Ultrafilter zur Eiweißabscheidung, Fa. Satorius, Göttingen

Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivität wurde im Tri-Carb-Counter (Fa. Packard) gemessen.* Ein Aliquot (in 2 ml Flüssigkeit) der zu untersuchenden Fraktion wurde in 15 ml Scintillator gelöst. Für wasserlösliche Substanzen setzte sich der Scintillator aus 0,25 g POPOP**, 10 g PPO***, 100 g Naphthalin ad 1 l Dioxan zusammen (variiert nach HAYES, 16). In Chloroform oder in Methanol gelöste Substanzen wurden im "Diotol"-Scintillator nach HERBERG (17) gemessen. Er wurde aus 250 ml Dioxan, 250 ml Toluol, 150 ml Methanol, 52 g Naphthalin, 65 mg POPOP und 3,25 g PPO hergestellt.

Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Verwendung fanden Glasplatten (20 x 20 cm), die vor dem Bestreichen mit einem in Methanol getränkten Lappen gereinigt wurden. Auf die Platten wurde mittels eines Streichgerätes**** Kieselgel G (Fa. Merck) 26 g/ 60 ml Wasser nach gutem Mischen (1 Min.) in einer Schichtdicke von 250 /u aufgetragen. Die Aktivierung erfolgte durch 30 Minuten langes Erhitzen bei 105° C. Die Platten wurden im Exsikkator bis zur Verwendung aufbewahrt. Laufmittel, Laufzeit und Nachweisreagenzien sind für die einzelnen Substanzen in Tabelle I zusammengefaßt. Alle Dünnschicht-Chromatographien wurden in "Sandwich-Kammern" (Fa. Camag, Mutenz/Schweiz) bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Steighöhe betrug zwischen 10 und 13 cm. Die als Referenzsubstanzen benutzten Phosphatide wurden in Chloroform gelöst (ca. 100 mg / 5 ml) und in Mengen von 5 bis 10 /ul punktförmig am Start aufgetragen. Die im System Ammoniak-Äthanol verwandten Testsubstanzen Äthanolamin, Cholin, Serin und Inosit lagen als 0,04 molare wässrige Lösungen vor. Von Phosphoryläthanolamin***** wurden 100 mg in 2,5 ml Wasser gelöst. Aufgetragen wurden jeweils 5 /ul, von radioaktivem Äthanolamin 5 10^{-3} /uC. Für die zweidimensionale DC wurden 5 /ul eines 0,02 molaren Testgemisches aus 14 Aminosäuren (s. Tabelle I)

---

*Für die Durchführung der Radioaktivitätsmessung danke ich Dr.K.H. Kolb (Schering AG, Berlin West)
**Dimethyl-POPOP 1, 4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol, Packard Instrument GmbH, Frankfurt a.M.
***PPO 2, 5-Diphenyloxazol (Packard)
****Streichgerät für DC, Fa. Desaga, Heidelberg
*****o-Phosphoryläthanolamin-Ba, Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland Ohio

Tabelle I

Dünnschicht-chromatographische Untersuchungen

Substrat	Testsubstanz	Laufmittel	Laufzeit	Nachweisreagenz
J H	Colaminkephalin* Lecithin aus Eiern "reinst"** Lysolecithin*	Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4 v/v) (37)	60 Min.	Ammoniummolybdat-Perchlorsäure (37)
Phosphatid-hydrolysat F_x G_1 x_1, x_2 (s. Abb. I)	Äthanolamin Äthanolamin-^{14}C Phosphoryläthanolamin Cholin Serin Inosit	Ammoniak 7 % - Äthanol 96 % (2:1 v/v) (20)	130 Min.	0,5 % wässrige Kaliumpermanganatlösung (20) Ninhydrin-Kollidin (37)
F_x G_1	Äthanolamin-^{14}C Aminosäuregemisch: Asparaginsäure, Lysin, Glutaminsäure Glycin, Serin, α-Alanin, Prolin, Histidin, Valin, Leucin, Threonin, Citrullin, Arginin, Phenylalanin	1. Richtung: Chloroform-Aceton-Methanol-Ammoniak 17% (1:1:2:1 v/v) 2. Richtung: Phenol-Wasser (75:25 g/g) (37)	70 Min. 180 Min.	Ninhydrin-Kollidin (37)

*Für die Unterstützung mit Testsubstanzen danke ich der wissenschaftlichen Direktion der Fa. Nattermann, Köln

**Fa. Merck, Darmstadt

benutzt. Vor dem Besprühen wurden die Platten von Lösungsmittelspuren durch 10 bis 20 Minuten langes Trocknen im warmen Luftstrom befreit. Die für die Salzsäurehydrolyse oder Rechromatographie vorgesehenen Flecken blieben ungefärbt. Ihre Lokalisation wurde durch Färbung von Referenzsubstanzen an beiden seitlichen Rändern der Platte und durch Vergleich mit dem entsprechenden Autoradiogramm ermittelt. Die Phosphatide wurden mit Chloroform herausgelöst, x_1, x_2 (s. Abb. I) mit Chloroform und anschließend mit Wasser. Bis zu 300 mg Kieselgel wurden fünfmal mit je 2 ml Flüssigkeit extrahiert*.

Autoradiographie (AR)

Zum Schutz der leicht ablösbaren Kieselgelschicht und um chemische Reaktionen gefärbter Platten mit dem Röntgenfilm** zu vermeiden, wurden die Chromatogramme mit einer durchsichtigen Folie*** abgedeckt. In Vorversuchen konnte keine Intensitätsminderung der Testflecken ($5 \cdot 10^{-3}$ /uC Äthanolamin-^{14}C) auf dem Röntgenfilm im Vergleich zu ungeschützten Platten festgestellt werden. Die Expositionszeit betrug 4 bis 16 Wochen. Die Entwicklung erfolgte im Röntgen-Rapid-Entwickler (Tetanol-Photowerke, Hamburg-Berlin).

Hydrolyse der Phosphatide

Die im System Chloroform-Methanol-Wasser fraktionierten Phosphatide der Epidermis wurden gleichzeitig aus mehreren Platten herausgelöst, da die in einem Fleck vorhandene Substanzmenge sehr gering ist. Es wurde darauf geachtet, daß die radioaktiven Verunreinigungen x_1 und x_2 sowie Fleck 7 und 8 (s. Abb. I) nicht mit erfaßt wurden. Die eluierten Phosphatide wurden im Vakuum bei 40° C eingeengt, in eine 10-ml-Ampulle gebracht und mit 6 ml 6 n Salzsäure versetzt. Nach Einleiten von Stickstoff wurde die Ampulle zugeschmolzen und 24 Stunden lang bei 120° C im Trockenschrank gehalten. Das Hydrolysat wurde anschließend filtriert und durch achtmaliges Eindampfen vom Salzsäureüberschuß befreit.

---

*Die Elution erfolgte mit dem Fleckeneluator für DC, Fa. Desaga, Heidelberg.
**Dupont Cornex II Röntgenfolienfilm, Sicherheitsfilm auf Blauunterlage, ADOX Fotowerke, Frankfurt a.M.
***Frapan-Haushaltsfolie von Kraft

II. Ergebnisse

Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivität aller bei der Epidermisaufarbeitung anfallenden Endprodukte wurde gemessen (s. Tabelle II). Ein deutlicher Unterschied zwischen Inkubationsansätzen mit und ohne Glukose konnte nur in Fraktion F_x und G_1 festgestellt werden. Bei Glukose enthaltenden Ansätzen trat eine Verschiebung der Radioaktivität von F_x nach G_1 auf. Der Hauptteil lag in diesen beiden Fraktionen, die etwa 95 % der Gesamtaktivität aufwiesen, während auf den Phosphatidextrakt nur durchschnittlich 0,5 % entfielen.

Tabelle II

Radioaktivität der Epidermisfraktionen in % der Gesamtaktivität

Fraktion	Versuch Nr. 3 ohne Glukose	Versuch Nr. 4 mit Glukose	Versuch Nr. 5 mit Glukose
D_1	0,56	1,33	2,26
$D_{2\alpha}$	0,23	0,13	0,08
$D_{2\beta}$	0,05	0,04	0,03
F_x	59,92	28,11	21,25
G_1	34,72	67,97	72,88
G_2	1,21	0,21	1,33
H	0,27	0,05	0,16
J	0,49	0,28	0,83
K	2,55	1,88	1,18
$F_x + G_1$	94,64	96,18	94,13

DC und AR der Epidermis-Phosphatide

Die Phosphatide der Epidermis wurden im System Chloroform-Methanol-Wasser fraktioniert und mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagenz nachgewiesen (s. Abbildung I). Es zeigten sich dunkelblaue Flecken auf bläulichem Grund. Lecithin war in seinem startnahen Anteil schwächer gefärbt und von einem dunklen Saum umgeben. Als Referenzsubstanzen dienten Lecithin aus Eiern "reinst" und Lysolecithin. Ersteres enthielt neben Lecithin auch Lysolecithin, Sphingomyelin und Colaminkephalin. Die Trennung der Epidermis-Phosphatide ergab acht Flecken. Mittels Testsubstanzen konnte Fleck 2 als Sphingomyelin, Fleck 3 als Lecithin und Fleck 6 als Colaminkephalin identifiziert werden. Bei Fleck 4 und 5 handelt es sich wahrscheinlich um Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin. Bei 7 zeigten sich aufgesplitterte, linienförmig ausgezogene Flecken in Höhe einer als zweite Lösungsmittelfront imponierenden Zone. Die Rf-Werte der Lipide blieben dadurch unbeeinflußt. Fleck 8 entspricht in seiner Lokalisation dem für Cholesterinester und Triglyceride angegebenen Rf-Wert (15). Das Autoradiogramm zeigte nach achtwöchiger Exposition eine Radiomarkierung von Spot 6 = Colaminkephalin sowie eine schwache Markierung von Spot 3 = Lecithin. Die Hauptmenge der Radioaktivität lag in den startnahen Flecken x_1 und x_2. Sie waren auf der Dünnschichtplatte mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure nicht anfärbbar.

Wurden die Chromatogramme mit größeren Mengen der Fraktion J beschickt, so kam ein weiterer Fleck unmittelbar über dem Lecithin zur Darstellung (s. Spot 4 Abbildung II), der vermutlich dem Lysocolaminkephalin (45) entspricht. Phosphatidylinosit, Phosphatidylserin und Colaminkephalin wurden nicht mehr getrennt, sondern überlagerten sich in einem lang ausgezogenen Fleck. Beim zugehörigen Autoradiogramm wurde die Expositionszeit verdoppelt. Als radioaktiv markiert erwiesen sich neben Colaminkephalin (Spot 5) und Lecithin (Spot 3) auch Sphingomyelin (Spot 2) und der als Lysocolaminkephalin interpretierte Fleck (Spot 4). Die stärkste Markierung zeigte sich wiederum in den Flecken x_1, x_2.

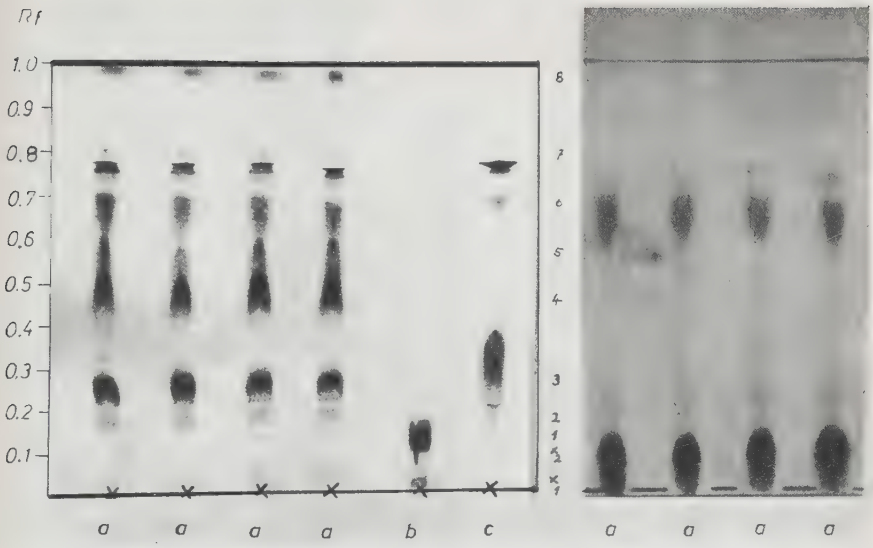


Abbildung I

DC (li.) und AR (re.) der Epidermis-Phosphatide

Laufmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4 v/v)

Nachweisreagenz: Ammoniummolybdat-Perchlorsäure

Aufgetragen:
- a: Fraktion J (Versuch Nr. 5)
- b: Lysolecithin
- c: Lecithin aus Eiern "reinst"

x_1, x_2 = ?
- 1 = Lysolecithin
- 2 = Sphingomyelin
- 3 = Lecithin
- 4 = Phosphatidylinosit?
- 5 = Phosphatidylserin?
- 6 = Colaminkephalin
- 7 = Artefakt?
- 8 = Cholesterinester und Neutralfette?

Expositionszeit der AR: 8 Wochen

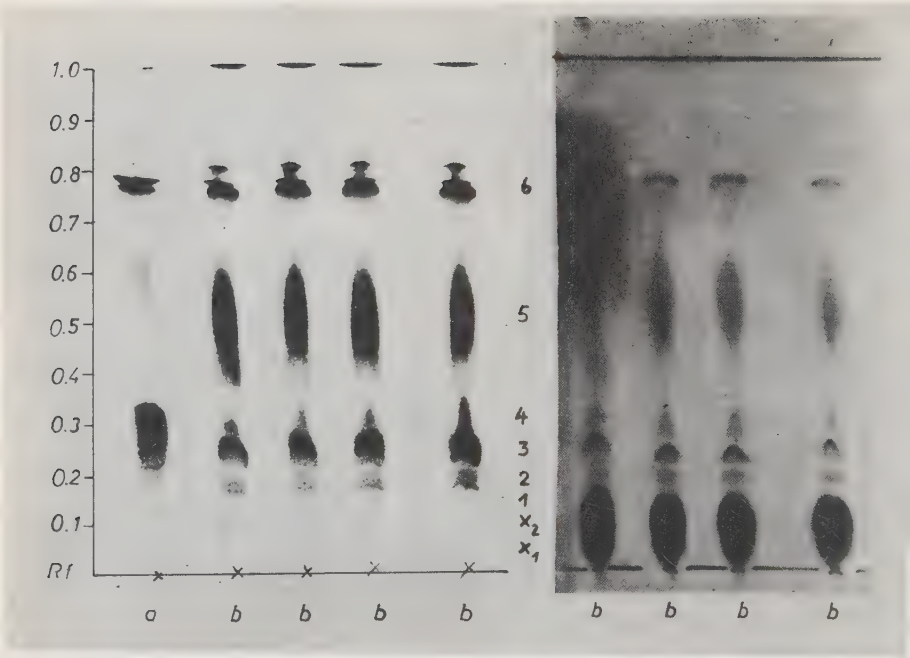


Abbildung II

DC (li.) und AR (re.) der Epidermis-Phosphatide

Laufmittel und Nachweisreagenz wie in Abb. I

Aufgetragen:
a: Lecithin aus Eiern "reinst"
b: Fraktion J (Versuch Nr. 4) etwa doppelte Menge wie in Abb. I

x_1, x_2 = ?
1 = Lysolecithin
2 = Sphingomyelin
3 = Lecithin
4 = Lysocolaminkephalin?
5 = Phosphatidylinosit + Phosphatidylserin + Colaminkephalin
6 = Artefakt?

Expositionszeit der AR: 16 Wochen

Wurden aliquote Teile der Fraktion J von Inkubationsansätzen mit und ohne Glukose im Autoradiogramm verglichen, so war kein Intensitätsunterschied in der Markierung der Phosphatide erkennbar.

DC und AR von x_1, x_2

Die Flecken x_1, x_2 wurden nach Elution im System Ammoniak-Äthanol rechromatographiert und mit Ninhydrin-Kollidin-Reagenz gefärbt (s. Abbildung III). Es ergab sich eine Aufteilung in fünf rot bis rotviolette Flecken, von denen Fleck 1 mit Phosphoryläthanolamin und Fleck 2 mit Äthanolamin korrespondierte. Bei Spot 3, 4 und 5 handelt es sich wahrscheinlich um Aminosäuren. Aus dem entsprechenden Autoradiogramm ist zu ersehen, daß die Radioaktivität von x_1, x_2 durch Äthanolamin-^{14}C bedingt ist.

DC und AR des Phosphatidhydrolysates

Die aus der Dünnschichtplatte eluierten Phosphatide wurden nach der Hydrolyse im Laufmittel Ammoniak-Äthanol chromatographiert (s. Abbildung IV). Als Testsubstanzen dienten Serin, Inosit, Cholin und Äthanolamin-^{14}C. Nach Färbung mit Kaliumpermanganat erschienen auf rotem Grund gelbe Flecken, die bald weiß wurden, während sich der Grund gelb-braun verfärbte. Cholin war nur schwach und flüchtig darstellbar. Das Hydrolysat ließ Spuren von Cholin, Äthanolamin und Inosit erkennen, während sich im Rf-Bereich von Serin - möglicherweise durch mitgeführte Verunreinigungen - ein intensiv gefärbter Fleck zeigte. Im Autoradiogramm erwies sich nach sechswöchiger Exposition Äthanolamin als schwach markiert. Die Menge radioaktiven Cholins war offenbar durch Verluste bei der Elution und der Hydrolyse so reduziert, daß sie dem Nachweis entging.

DC und AR der Fraktion H

Um die Wirksamkeit der Phosphatidfällung aus dem komplexen Lipidextrakt (F_2 s. Schema I) zu prüfen, wurde die Fraktion H im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser chromatographiert. Phosphatide waren nicht mehr nachweisbar. Nahe der Lösungsmittelfront kamen die Lipide als teilweise ineinander übergehende Flecken im Rf-Bereich von 0,7 bis 1,0 mittels Ammoniummolybdat-Perchlorsäure zur Darstellung. Im Autoradiogramm konnte nur ein radioaktiver Bezirk nachge-

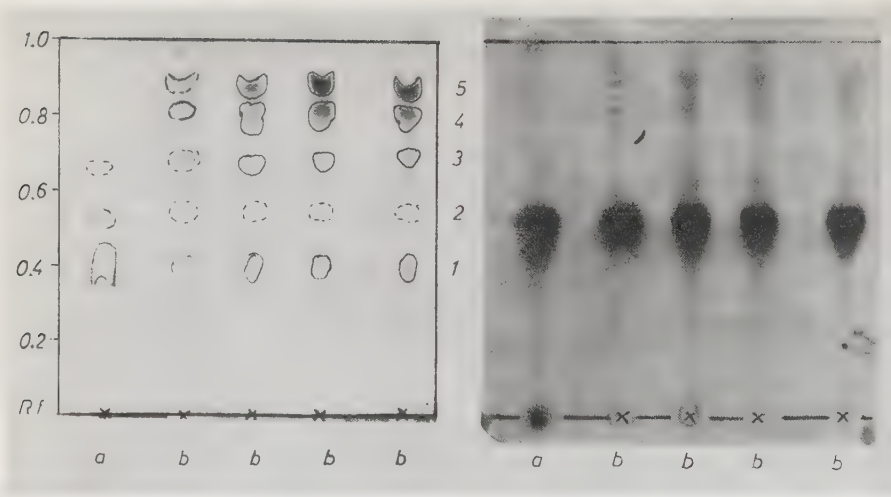


Abbildung III

DC (li.) und AR (re.) von x_1, x_2

Laufmittel: Ammoniak 7 % - Äthanol 96 % (2:1 v/v)

Nachweisreagenz: Ninhydrin-Kollidin

Aufgetragen:
a: Äthanolamin-^{14}C + Phosphoryläthanolamin
b: x_1, x_2 (Versuch Nr. 5)

1 = Phosphoryläthanolamin
2 = Äthanolamin
3,4,5 = Aminosäuren

Expositionszeit der AR: 10 Wochen

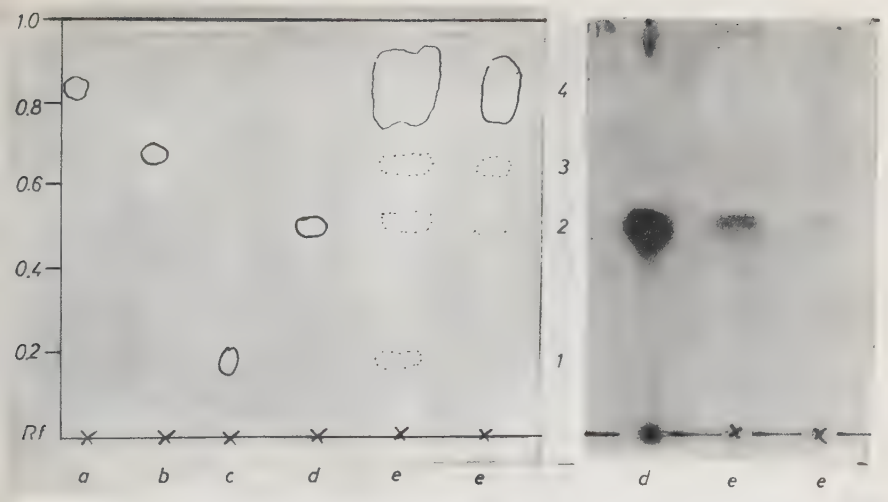


Abbildung IV

DC (li.) und AR (re.) des Phosphatidhydrolysates

Laufmittel: Ammoniak 7 % - Äthanol 96 % (2:1 v/v)

Nachweisreagenz: Kaliumpermanganat

Aufgetragen:
- a: Serin
- b: Inosit
- c: Cholin
- d: Äthanolamin-^{14}C
- e: Phosphatidhydrolysat

1 = Cholin
2 = Äthanolamin
3 = Inosit
4 = Serin

Expositionszeit der AR: 6 Wochen

wiesen werden, dessen Färbbarkeit und Rf-Wert den in Abbildung I und II als x_1, x_2 bezeichneten Flecken entsprach. Die Radioaktivität der Fraktion H ist also nicht durch ^{14}C-markierte Lipide bedingt, sondern durch Verunreinigung mit Äthanolamin-^{14}C.

DC und AR der Fraktionen F_x und G_1

Die Fraktionen F_x und G_1 wurden untersucht, weil sie die stärkste Radioaktivität aller bei der Epidermisaufarbeitung anfallenden Endprodukte zeigten. Die DC ergab nach Entwicklung in Ammoniak-Äthanol und Färbung mit Ninhydrin-Kollidin ein weitgehend entsprechendes Bild (s. Abbildung V und VI). In gleicher Höhe mit Phosphoryläthanolamin und Äthanolamin lagen zwei nur sehr schwach rot-violett gefärbte Flecken; es folgte ein roter und ein gelber Fleck. Bei Spot 5 und 6 überlagerten sich mehrere Aminosäuren. Die Referenzsubstanzen wurden mit Kaliumpermanganat nachgewiesen; dabei zeigte sich, daß Phosphoryläthanolamin mit Äthanolamin und zwei unbekannten Substanzen verunreinigt war. Die AR ließ erkennen, daß die Radioaktivität beider Fraktionen auf Äthanolamin-^{14}C zurückzuführen war. In G_1 bei Versuchen mit Glukosezusatz erwies sich ein weiterer Fleck als markiert. Dieser lag bei einem Rf-Wert von 0,7 zwischen Spot 4 und 5. Cholin (Rf-Wert 0,2) war nicht nachweisbar.

Die unbekannten Bestandteile der Fraktionen F_x und G_1 wurden teilweise mittels zweidimensionaler DC identifiziert. In Vorversuchen wurde ein Testgemisch aus 14 Aminosäuren (s. Tabelle I) chromatographiert und die Lage von Äthanolamin ermittelt. Die meisten Aminosäuren wurden mit Ninhydrin-Kollidin als rot bis rot-violette Flecken dargestellt bis auf Asparaginsäure, die blau, Glycin, das orange und Prolin, das gelb war. Äthanolamin wurde nur sehr schwach rot-violett gefärbt. Es lag in unmittelbarer Nachbarschaft von Serin und überlagerte es zum Teil. F_x konnte in sieben Aminosäuren aufgegliedert werden (s. Abbildung VII). In G_1 wurden zwölf Aminosäuren und zwei unbekannte Substanzen gefunden (s. Abbildung VIII). Im Autoradiogramm war jeweils nur ein radioaktiver Fleck nachweisbar, der in seiner Lokalisation dem Äthanolamin entsprach. Auch bei Inkubationsansätzen mit Glukose zeigte sich in G_1 keine weitere Markierung auf dem Röntgenfilm.

Abbildung V

DC (li.) und AR (re.) der Fraktion F_x

Laufmittel: Ammoniak 7 % - Äthanol 96 % (2:1 v/v)

Nachweisreagenz:
a, b: Kaliumpermanganat
c bis f: Ninhydrin-Kollidin

Aufgetragen:
a: Äthanolamin
b: Phosphoryläthanolamin
c: Fraktion F_x (Versuch Nr. 2)
d: Fraktion F_x (Versuch Nr. 3)
e: Fraktion F_x (Versuch Nr. 4)
f: Fraktion F_x (Versuch Nr. 5)
g: Äthanolamin- ^{14}C

1 = Phosphoryläthanolamin
2 = Äthanolamin
3 bis 6= Aminosäuren?

Expositionszeit der AR: 4 Wochen

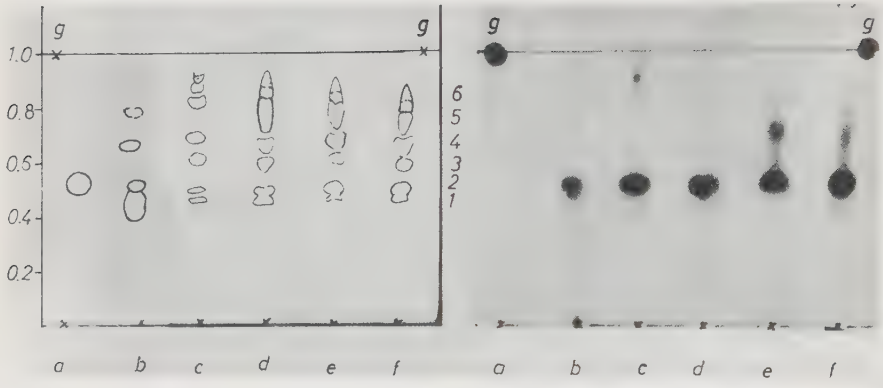


Abbildung VI

DC (li.) und AR (re.) der Fraktion G_1

Laufmittel und Nachweisreagenz wie in Abb. V

Aufgetragen:

a: Äthanolamin
b: Äthanolamin-^{14}C
c: Fraktion G_1 (Versuch Nr. 1)
d: Fraktion G_1 (Versuch Nr. 3)
e: Fraktion G_1 (Versuch Nr. 4)
f: Fraktion G_1 (Versuch Nr. 5)
g: Äthanolamin-^{14}C

1 = Äthanolamin
2 = Phosphoryläthanolamin
3 bis 6 = Aminosäuren

Expositionszeit der AR: 4 Wochen

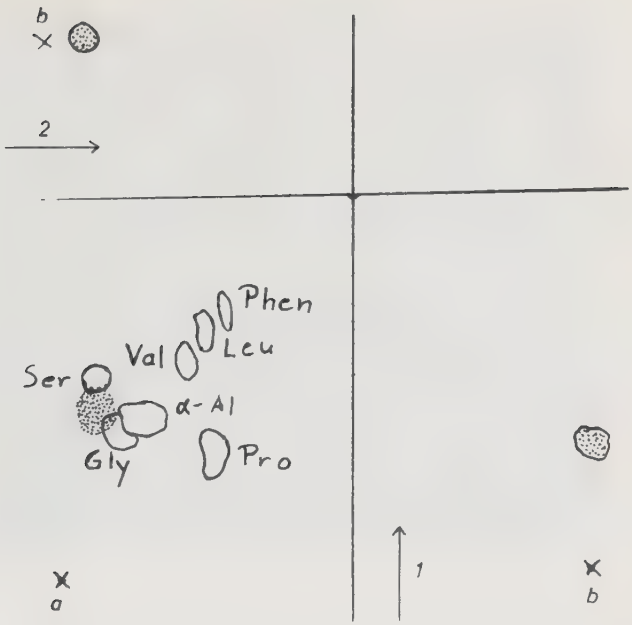


Abbildung VII

Zweidimensionale DC der Fraktion F_x

Laufmittel:
1. Richtung: Chloroform-Aceton-Methanol-Ammoniak 17 % (1:1:2:1 v/v)
2. Richtung: Phenol-Wasser (75:25 g/g)

Nachweisreagenz: Ninhydrin-Kollidin

Aufgetragen:
a: Fraktion F_x (Versuch Nr. 5)
b: Äthanolamin-^{14}C

Punktiert = Äthanolamin-^{14}C aus dem Autoradiogramm (Expositionszeit 6 Wochen) übertragen
Gly = Glycin
α-Al = α-Alanin
Pro = Prolin
Ser = Serin
Val = Valin
Leu = Leucin
Phen = Phenylalanin

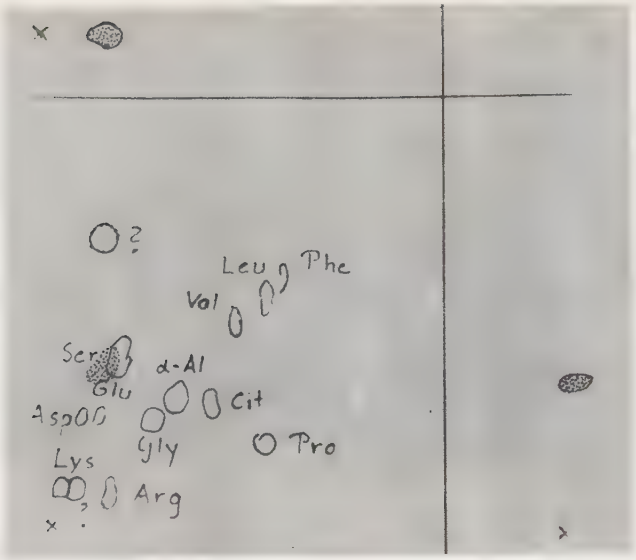


Abbildung VIII

Zweidimensionale DC der Fraktion G_1

Laufmittel und Nachweisreagenz wie in Abb. VII

Aufgetragen:
a: Fraktion G_1 (Versuch Nr. 5)
b: Äthanolamin-^{14}C

Punktiert = Äthanolamin-^{14}C aus dem Autoradiogramm (Expositionszeit 6 Wochen) übertragen

Lys = Lysin
Arg = Arginin
Gly = Glycin
Asp = Asparaginsäure
Glu = Glutaminsäure
Ser = Serin
α-Al = α-Alanin
Cit = Citrullin
Pro = Prolin
Val = Valin
Leu = Leucin
Phen = Phenylalanin

C. Diskussion

Besprechung der Ergebnisse

Wird die Epidermis mit Äthanolamin-^{14}C inkubiert, so lassen sich autoradiographisch markierte Phosphatide nachweisen. Kephalin zeigte von allen Phosphatiden die stärkste Radioaktivität; daneben stellten sich ^{14}C-markiertes Lecithin sowie Spuren von radio-etikettiertem Sphingomyelin und Lysokephalin (?) dar.

Bisher sind zwei Möglichkeiten der Kephalinsynthese bekannt. Kephalin kann einmal durch Decarboxylierung aus Phosphatidylserin gebildet werden (21). Ferner kann die Synthese aus Äthanolamin über Phosphoryläthanolamin, Cytidindiphosphat-Äthanolamin und Übertragung dieser Verbindung auf ein Diglycerid erfolgen (22). Wie der Einbau von Äthanolamin-^{14}C in Kephalin zeigt, wird der zuletzt beschriebene Weg von der Epidermis beschritten. Ob und gegebenenfalls in welchem Umfang eine Biogenese über Phosphatidylserin möglich ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Der hohe Lecithingehalt der Epidermis läßt auf einen entsprechend aktiven Stoffwechsel desselben schließen. Der bei den vorgelegten Versuchen relativ geringe Anteil an radioaktiv markiertem Lecithin ist durch die Wahl des Leitisotops in Form von Äthanolamin-^{14}C bedingt. Im Vergleich zur Kephalinsynthese ist beim Aufbau des Lecithins noch eine weitere Energie verbrauchende Reaktion, nämlich die vollständige Methylierung des Äthanolamins zu Cholin, notwendig.

Bei in-vitro-Versuchsbedingungen mit überlebender Epidermis war wohl nur eine geringe lipogenetische Aktivität derselben zu erwarten, wofür in der Tat die notwendig langen Expositionszeiten beim autoradiographischen Nachweis der gebildeten Phosphatide sprechen. Die Ursache für die verminderte Biogenese der Phosphatide in vitro im Vergleich zur in-vivo-Synthese liegt einmal im Nachlassen der anabolen Stoffwechselleistung, die von der Entnahme der Epidermis bis zum Ende der Inkubation laufend abnimmt (6, 13). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Homogenisieren die Phosphatidsynthese vollständig unterbindet (9, 13). Die mechanische Isolierung der Epidermis von der Cutis, wobei die Zellen weitgehend aus ihrem strukturellen Gefüge

herausgerissen werden, schafft ähnlich nachteilige Bedingungen. Der Zusatz von Antibiotika wie Penicillin und Streptomycin wirkt sich ebenfalls hemmend auf die Lipogenese aus, während bakterienhaltige Inkubationsansätze einen höheren Umsatz vortäuschen können.(13)

Die geringe Umsatzrate bei in-vitro-Versuchen erklärt die Tatsache, daß bei früheren Untersuchungen (11, 28) die hauteigene Phosphatidsynthese dem Nachweis entging.

Eine Steigerung der Phosphatidsynthese bei Versuchen mit Glukosezusatz wurde nicht festgestellt. Als Kriterium diente der autoradiographische Vergleich aliquoter Mengen des Phosphatidextraktes, der als semiquantitative Methode betrachtet werden kann.

Durch Untersuchungen von YARDLEY und GODFREY (46) ist bekannt, daß mit ^{32}P-Phosphat inkubierte Hautstückchen bei Mangel an exogenem Substrat weniger radioaktiv markierte Phosphatide aufweisen, während der Gehalt an radioaktivem Phosphorylcholin um das 30-fache ansteigt. Dieser Befund wurde auf einen Stop der Lecithinsynthese nach der Phosphorylierung des Cholins zurückgeführt. Das entsprechende Zwischenprodukt der Kephalinsynthese, Phosphoryläthanolamin, blieb unbeeinflußt vom Glukosezusatz zum Inkubationsmedium.

Es ist denkbar, daß in unseren Versuchen ein gesteigerter Lecithinaufbau durch die größere Streptomycinmenge, die sich bei Glukosezusatz als erforderlich erwies, verhindert wurde. Außerdem ist es möglich, daß Lecithin zum Teil durch Methylierung von Kephalin gebildet wurde und insofern unabhängig von der Zufuhr exogenen Substrates war.

Anhaltspunkte für eine Unterbrechung der Phosphatidsynthese mit Ansammlung von Zwischenprodukten wurden nicht gefunden. ^{14}C-markiertes Phosphoryläthanolamin war weder in Inkubationsversuchen mit noch ohne Glukose nachweisbar. Es wurde offenbar in dem Maße wie es gebildet wurde auch für die Phosphatidsynthese verbraucht. Radioaktives Cholin ließ sich ebenfalls nicht darstellen. Auch hier ist es denkbar, daß Äthanolamin-^{14}C nach Methylierung zu Cholin zum größten Teil in Lecithin oder Sphingomyelin eingebaut wurde, sofern im Falle der Lecithinsynthese die Methylierung nicht erst am Kephalinmolekül erfolgte.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, ist die Epidermis zu einer selbständigen Lipogenese von Colaminkephalin, Lecithin, Sphingomyelin und Lysocolaminkephalin (?) befähigt. Mit der autochthonen Synthese der übrigen in der Epidermis nachweisbaren Phosphatide ist daher wohl zu rechnen.

Kritik der Methode

Bei der Phosphatidfällung nach BLOOR (3) wurde zwar eine Trennung der Phosphatide von den übrigen Lipiden erreicht; in den Phosphatidextrakt gingen aber gleichfalls Äthanolamin-^{14}C und inaktive Verbindungen ein. Durch den verschiedenen Gehalt an Verunreinigungen konnte die Radioaktivitätsmessung der Fraktion J nicht zur Beurteilung des Einbaus von Äthanolamin-^{14}C in die Phosphatide der Epidermis herangezogen werden.

Lücken der Arbeit

Die Radioaktivität der dünnschicht-chromatographisch und autoradiographisch untersuchten Fraktionen der Epidermisaufarbeitung F_x, G_1 und H konnte jeweils auf Äthanolamin-^{14}C zurückgeführt werden, bei Fraktion J zusätzlich auf ^{14}C-markierte Phosphatide. Die Fraktionen D_1, $D_{2\alpha}$, $D_{2\beta}$, G_2 und K wiesen eine geringe Radioaktivität auf. Sie wurden nicht weiter untersucht. Voraussichtlich ist ihre Radioaktivität ebenfalls durch Beimengung von Äthanolamin-^{14}C bedingt.

D. Zusammenfassung

1. Es wurde untersucht, ob die Epidermis zu einer autochthonen Phosphatidsynthese befähigt ist.

2. 3 g mechanisch isolierter Meerschweinchenepidermis wurden mit 5 µC Äthanolamin-^{14}C mit und ohne Glukosezusatz in vitro für 4 Std. inkubiert. Die Radioaktivität der bei der Epidermisaufarbeitung anfallenden Fraktionen wurde gemessen. Die einzelnen Fraktionen wurden weiterhin dünnschicht-chromatographisch und autoradiographisch untersucht.

3. Im Phosphatidextrakt war radioaktiv markiertes Kephalin, Lecithin, Sphingomyelin und Lysokephalin (?) nachweisbar.

4. Die Radioaktivität der übrigen Fraktionen war durch Kontaminierung mit Äthanolamin-^{14}C bedingt.

5. Glukosezusatz zum Inkubationsmedium hatte keine Steigerung der Phosphatidsynthese zur Folge.

6. Schritte und Wege der epidermalen Phosphatidsynthese sowie die Auswirkungen der Versuchsbedingungen auf die Lipogenese wurden diskutiert.

E. Literatur

1. BEVERIDGE, J.M.R.: The function of phospholipids. Can. J. Biochem. Physiol. 34: 361-371 (1956)

2. BLOMSTRAND, R.S., FREGERET, S. and NAKAYAMA, F.: Phospholipid composition of human epidermis. Acta Dermato.-Vener. 41: 281-288 (1961)

3. BLOOR, W.R.: J. biol. Chem. 82: 273 (1929). Zit. nach HINSBERG, K. und LANG, K.: Medizinische Chemie, 3. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1957)

4. BLOOR, W.R.: Phospholipid content and physiological activity of tissues. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 27: 294 (1930)

5. BRAUN-FALCO, O.: Die Histochemie der Haut. III. Die Histographie der Lipoide. In "Dermatologie und Venerologie" I/1 S. 381-396 (H.A. Gottron und W. Schönfeld Herausgeber) Georg Thieme Verlag Stuttgart (1961)

6. CARNEY, S.A., LAWRENCE, J.C. and RICKETTS, C.R.: The incorporation of phosphate by mammalian skin in tissue culture. Exp. Cell Res. 27: 587-591 (1962)

7. CROUNSE, R.G.: The association of lipids with keratinous proteins of human callus. J. invest. Derm. 46: 550 - 554 (1966)

8. EDWARDS, S.W. and BALL, E.G.: The action of phospholipases on succinate oxidase and cytochrome oxidase. J. biol. Chem. 209: 619-633 (1954)

9. FISCHLER, M.C., TAUROG, A., PERLMAN, I. and CHAIKOFF, I.L.: The synthesis and breakdown of liver phosphatid in vitro with radioactiv phosphorus as indicator. J. biol. Chem. 141: 809-818 (1941)

10. GERSTEIN, W.: The phospholipids of normal and psoriatic skin. J. invest. Derm. 40: 105-109 (1963)

11. GLASENAPP, I.v.: Über den Phosphatidstoffwechsel der Haut. Arch. Derm. Syph. (Berlin) 200: 66-68 (1955)

12. GREEN, D.E. and FLEISCHER, S.: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 70: 554 (1963). Zit. nach DEBUCH, H.: 16. Mosbacher Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie, S. 9-28, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1966)

13. GRIESMER, R.D. and THOMAS, R.W.: Lipogenesis in human skin. II. The effect of physical and chemical faktors on in vitro lipogenesis from acetate. J. invest. Derm. 41: 95-98 (1963)

14. GRIESMER, R.D. and THOMAS, R.W.: Lipogenesis in human skin. III. Variation with body site. J. invest. Derm. 41: 235-238 (1963)

15. HABERMANN, E., BANDTLOW, G. und KRUSCHE, B.: Bestimmung von Plasma-Phospholipoiden nach Dünnschicht-chromatographie. Klin. Wochenschr. 39: 816-817 (1961)

16. HAYES, F.N.: Solutes and solvents for liquid scintillation counting. Technical Bulletin Nr. 1, Packard Instrument Company Inc. (1966)

17. HERBERG, R.J.: Analyt. Chem. 32: 42 (1960). Zit. aus "Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie." Bd. I, 2. Aufl. S. 174 (H. Schwiegk und F. Turba, Herausgeber) Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1961)

18. JARRETT, A. and SPEARMAN, R.I.C.: Histochemistry of the Skin-Psoriasis. The Engl. Univ. Press London (1964)

19. JARRETT, A., SPEARMAN, R.I.C., RILEY, P.A. and CANE, A.K.: The distribution of epidermal phospholipids and their relation to the alkaline phosphatase activity of the granular layer. J. invest. Derm. 44: 311-319 (1965)

20. KAUFMANN, H.P., WESSELS, H. und BONDOPADHYAYA, C.: Dünnschicht-Chromatographie auf dem Fettgebiet XI: Die Analyse der Lecithine und der hydrolytischen Spaltprodukte der Phosphatide. Fette, Seifen, Anstrichmittel 7: 543-547 (1963)

21. KAUTER, J. and KENNEDY, E.P.: Metabolism and function of bacterial lipids. II. Biosynthesis of Phospholipids in Escherichia coli. J. biol. Chem. 239: 1720 - 1726 (1964)

22. KENNEDY, E.P.: Die Stoffwechselfunktion der Cytidin-Coenzyme. 11. Mosbacher Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie. S. 60-76 Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1961)

23. KIELLEY, W.W. and MEYERHOF, O.: Studies on adenosinetriphosphatase of muscle. III. The lipoprotein nature of the magnesium activated adenosinetriphosphatase. J. biol. Chem. 183: 391-401 (1950)

24. KIMMIG, J. und WEHRMANN, R.: Biochemie der Haut. In "Dermatologie und Venerologie" I/2, 1220-1225 (H.A. Gottron und W. Schönfeld Herausgeber) Georg Thieme Verlag Stuttgart (1962)

25. KOLTHOFF, I.M., zit. nach HINSBERG, K. und LANG, K.: Medizinische Chemie, 3. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1957)

26. KOOYMAN, D.J.: Lipids of the skin. Some changes of the lipids of the epidermis during the process of keratinization. Arch. Dermatol. and Syphilol. 25: 444-450 (1932)

27. KREBS, H.A., BARTLEY, W., GRIFFITHS, D.E. and STOCKEN, L.A.: V. Tissue Preparation in vitro. In "Biochemisches Taschenbuch" Bd. I, 2. Aufl., S. 522-541 (H.M. Rauen, Herausgeber) Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York (1964)

28. LEONHARDI, G., GLASENAPP, I.v. und KRAUSE, P.: Über den Phosphatidstoffwechsel der Haut. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 295: 310-317 (1953)

29. LIPKIN, G., WHEATLY, V.R. and MARCH, C.: Studies of the lipids of dog skin. III. The in vivo incorporation of acetate, pyruvate, and certain amino acids into the lipids of isolated perfused dog skin. J. invest. Derm. 45: 356-361 (1965)

30. MARINETTI, G.V., KOCHEN, J., ERBLAND, J. and STOTZ, E.: The lipide composition of a purified cytochrome preparation of pig heart. J. biol. Chem. 229: 1027 - 1035 (1957)

31. MORRISON, M., CRAWFORD, R. and STOTZ, E.: The reactivation by lipids of the succinate-cytochrome c reductase system. Biochim. biophys. Acta 22: 579-581 (1956)

32. NASON, A. and LEHMAN, I.R.: The role of lipides in electron transport. II. Lipide cofactor replaceable by tocopherol for the enzymatic reduction of cytochrome c. J. biol. Chem. 222: 511-530 (1956)

33. NICOLAIDES, N. and ROTHMAN, S.J.: The site of sterol and squalene synthesis in the human skin. J. invest. Derm. 24: 125-129 (1955)

34. NICOLAIDES, N.: Lipids, Membranes, and the Human Epidermis. In "The Epidermis" S. 511-538 (W. Montagna and W. C. Lobitz, Jr., Herausgeber) New York Academic Press (1964)

35. OUTHOUSE, E.L. and FORBES, J.C.: J. lab. clin. Med. 25: 1157 (1940). Zit. nach HINSBERG, K. und LANG, K.: Medizinische Chemie, 3. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1940)

36. PATTERSON, J.F. and GRIESMER, R.D.: Lipogenesis in human skin, J. invest. Derm. 33: 281-285 (1959)

37. RANDERATH, K.: Dünnschicht-Chromatographie, 2. Aufl., Chemie GmbH Weinheim (1965)

38. REWALD, B. and SCHWIEGER, A.: Über den Phosphatidgehalt der Haut. Biochem. Ztschr. 259: 180-181 (1933)

39. ROTHMAN, S.: Physiology and biochemistry of the skin. University of Chicago Press (1954)

40. SCOTT, E.J. van: Mechanical separation of the epidermis from the corium. J. invest. Derm. 18: 377-379 (1952)

41. SINCLAIR, R.G.: The physiology of the phospholipids. Physiol. Rev. 14: 351-403 (1934)

42. SWANBECK, G.: Macromolecular organization of epidermal keratin Acta Dermato.-Vener. 39: suppl. 43, 1-37 (1959)

43. SCHWARZ, H.P., DREISBACH, L., STAMBAUGH, R., KLESCHICK, A. and BARRIONUEVO, M.: Chromatography of the phospholipides of rabbit skin. Arch. Biochem. Biophys. 87: 171-178 (1960)

44. TAYLOR, J.D., PAUL, H.E. and PAUL, M.F.: Biochemistry of wound healing. III. Total lipid, phospholipid, and cholesterol content of skin and repair tissue of skin wounds. Arch. Biochem. 17: 421-428 (1948)

45. WAGNER, H.: Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der Isolierung und Analytik von Phosphatiden und Glykolipiden. Fette, Seifen, Anstrichmittel 62: 1115-1123 (1960)

46. YARDLEY, H.J. and GODFREY, G.: Metabolism of phosphate esters and phospholipids in skin maintained in vitro. J. invest. Derm. 43: 51-57 (1964)

47. YARDLEY, H.J. and GODFREY, G.: Acid-soluble phosphates in normal and psoriatic skin. Brit. J. Derm. 76: 529-536 (1964)

Lebenslauf

Am 20. Juni 1938 wurde ich, Maria-Luise Kern, in Baden-Baden geboren als Tochter des Chemikers Dr. Ing. Heinrich Kern und seiner Ehefrau Else, geb. Dieringer.

Im September 1944 wurde ich in Hechingen eingeschult; im Februar 1959 bestand ich an der Sophie-Barat-Schule in Hamburg das Abitur. Zum Sommersemester 1959 schrieb ich mich an der Universität Hamburg für das Fach Medizin ein. Ab Wintersemester 1962/63 studierte ich an der Freien Universität Berlin, wo ich am 6. April 1965 das medizinische Staatsexamen bestand.

Seit dem 1. September 1965 bin ich als Medizinalassistentin tätig.